

JCO7R PCT/PTD 17 DEC 2001
10/009782

DOCKET NO.: 217301 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Ken-ichi TAKEUCHI, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/03932

INTERNATIONAL FILING DATE: June 15, 2000

FOR: TRANSFORMED MICROORGANISM AND PROCESS FOR PRODUCING D-AMINOACYLASE

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Japan	11-170555	17 June 1999

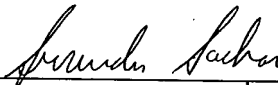
Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP00/03932. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)


Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

THIS PAGE BLANK (USPTO)

10/009782

CT/JP00/03932

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

04 AUG 2000

15.06.00

E U

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 6月17日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第170555号

出 願 人

Applicant (s):

天野製薬株式会社

REC'D 04 AUG 2000

WIPO PCT

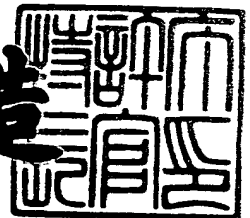
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 7月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3057379

【書類名】 特許願

【整理番号】 POK-99-022

【提出日】 平成11年 6月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 1/21
C12N 9/00

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷 5 1 天野製
薬株式会社中央研究所内

【氏名】 竹内 賢一

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷 5 1 天野製
薬株式会社中央研究所内

【氏名】 小出 芳直

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷 5 1 天野製
薬株式会社中央研究所内

【氏名】 広瀬 芳彦

【発明者】

【住所又は居所】 大分県大分市大字旦野原 7 0 0 番地

【氏名】 森口 充瞭

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県盛岡市黒石野 3 丁目 1 5 の 4 0

【氏名】 磯部 公安

【特許出願人】

【識別番号】 000216162

【氏名又は名称】 天野製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100097733

【弁理士】

【氏名又は名称】 北川 治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 049766

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9906404

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 形質転換微生物、D-アミノアシラーゼの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 亜鉛耐性を示す宿主微生物に、亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が増強される D-アミノアシラーゼ産生遺伝子を導入し、亜鉛イオンを含む培地における D-アミノアシラーゼ高生産性形質を獲得させたことを特徴とする形質転換微生物。

【請求項 2】 前記 D-アミノアシラーゼ産生遺伝子が、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有するか、又は配列表の配列番号 1 に示す塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって D-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものであることを特徴とする請求項 1 に記載の形質転換微生物。

【請求項 3】 前記宿主微生物が大腸菌であることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 のいずれかに記載の形質転換微生物。

【請求項 4】 前記宿主微生物への D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の導入に当たり、該遺伝子に対して以下の (1) 及び (2) の改変を行ったことを特徴とする請求項 1 ～請求項 3 のいずれかに記載の形質転換微生物。

(1) リボソーム結合領域に特定塩基配列 (G A A G G A) を設計して、該遺伝子の翻訳開始点上流 9 塩基の位置に導入することにより、翻訳効率の向上を図る改変。

(2) 大腸菌の H i n d III 認識部位を該遺伝子上流と下流に作成し、該遺伝子を純化して切り出し発現ベクターへ連結することにより遺伝子の発現効率の向上を図る改変。

【請求項 5】 請求項 1 ～請求項 4 のいずれかに記載の形質転換微生物を亜鉛イオンを含む培地で培養し、培養物から D-アミノアシラーゼを取得することを特徴とする D-アミノアシラーゼの製造方法。

【請求項 6】 前記培地に含まれる亜鉛イオン濃度を 0. 1 ～ 1 0 m M に制御することを特徴とする請求項 5 に記載の D-アミノアシラーゼの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、D-／L-アミノアシラーゼのうちD-アミノアシラーゼのみを選択的に生産させるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を亜鉛耐性微生物に導入してなる形質転換微生物、及び該形質転換微生物を利用したD-アミノアシラーゼの製造方法に関する。D-アミノアシラーゼは、抗生物質の側鎖やペプチド医薬品等の用途に求められる光学純度の高いD-アミノ酸の製造等の点において、産業上有用な酵素である。

【0002】

【従来技術】

従来、D-／L-アミノアシラーゼを同時に生産する微生物として、ケミカル・アンド・ファルマシューティカル・ブリテン (Chemical and Pharmaceutical Bulletin) 26, 2698(1978)にはシュードモナス・エスピー (*Pseudomonas* sp.) AAA6029 株が、又、特開昭53-59092号公報には、ストレプトミセス・オリバセウス (*Streptomyces olivaceus*) S-62等の放線菌が、それぞれ開示されている。

【0003】

これらの微生物を利用した場合、D-アミノアシラーゼの生産能力はさておき、光学異性体であるD-アミノアシラーゼとL-アミノアシラーゼとを同時に生産してしまうため、両者を分離するという煩雑で高コストな操作を余儀無くされる欠点がある。

【0004】

一方、D-／L-アミノアシラーゼのうちD型のみを選択的に生産する微生物として、例えば特開平1-5488号公報に係る発明では、アルカリゲネス・デニトリフィカンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス (*Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans*) MI-4 株が開示されている。

【0005】

この菌株を利用した場合、D-／L-アミノアシラーゼの分離と言う面倒がないものの、D-アミノアシラーゼの生産能力が不十分であった。しかも特開平1

ー5488号公報では、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子が構造的に解明されていないため、D-アミノアシラーゼの生産能力を向上させるための遺伝子の改変、高生産性形質転換微生物の創製等を図ることができなかった。

【0006】

以上の点に鑑み、森口らを中心とする本願発明者は、アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス (*Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans*) A-6株が有するD-アミノアシラーゼ産生遺伝子の構造を解明し、配列表の配列番号1に係る塩基配列を示した。さらに、このD-アミノアシラーゼ産生遺伝子に一定の改変を加えることにより、形質転換微生物のD-アミノアシラーゼ生産能力を顕著に向上させることに成功した (Protein Expression and Purification 7,395-399(1996))。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、その後の研究により、上記D-アミノアシラーゼ産生遺伝子を導入した各種形質転換微生物は、一般的に、亜鉛イオンを含む培地において、特にその亜鉛イオン濃度を一定の範囲に制御することによって、そのD-アミノアシラーゼ生産能力が大きく向上する、という新たな知見が得られた。

【0008】

更に、このような培地への亜鉛イオン添加によるD-アミノアシラーゼ生産能力向上の効果は、宿主微生物の種類によって発現の度合いが大きく異なり、この効果の発現度合いの大きい宿主微生物は一般的に、形質転換前においても亜鉛耐性を示すこと、即ち、菌体量 (A660nm) を以て測定される繁殖能力が亜鉛イオン添加によって阻害され難い傾向がある、という新たな知見も得られた。

【0009】

そこで本発明は、上記D-アミノアシラーゼ産生遺伝子で形質転換された微生物であって、培地への亜鉛イオンの添加により、D-アミノアシラーゼ生産能力が更に大きく増強されるものを提供することを、その解決すべき技術的課題とする。

【0010】

【着眼点】

本願発明者は、上記の知見に基づき、①配列表の配列番号 1 に示す D-アミノアシラーゼ産生遺伝子を持つ形質転換微生物は、理由は明確ではないが、一定量の亜鉛イオンの存在により発現が増強されること、②亜鉛イオンは一般的に微生物に対して阻害的に働くと考えられることから、上記亜鉛イオンの効果を十分に確保するためには、上記遺伝子を導入するための宿主として、元々亜鉛耐性を備えた微生物を選択する必要があること、の 2 点に想到し、本願発明を完成した。

【0011】

【課題を解決するための手段】

(第 1 発明の構成)

上記課題を解決するための本願第 1 発明（請求項 1 に記載の発明）の構成は、亜鉛耐性を示す宿主微生物に、亜鉛イオンの存在により遺伝子産物の発現が増強される D-アミノアシラーゼ産生遺伝子を導入し、亜鉛イオンを含む培地における D-アミノアシラーゼ高生産性形質を獲得させた、形質転換微生物である。

【0012】

(第 2 発明の構成)

上記課題を解決するための本願第 2 発明（請求項 2 に記載の発明）の構成は、前記第 1 発明に係る D-アミノアシラーゼ産生遺伝子が、配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有するか、又は配列表の配列番号 1 に示す塩基配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって D-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものである、形質転換微生物である。

【0013】

(第 3 発明の構成)

上記課題を解決するための本願第 3 発明（請求項 3 に記載の発明）の構成は、前記第 1 発明又は第 2 発明に係る宿主微生物が大腸菌である、形質転換微生物である。

【0014】

(第 4 発明の構成)

上記課題を解決するための本願第 4 発明（請求項 4 に記載の発明）の構成は、

前記第1発明～第3発明のいずれかにおいて、宿主微生物へのD-アミノアシラーゼ産生遺伝子の導入に当たり、該遺伝子に対して以下(1)及び(2)の改変を行った、形質転換微生物である。

(1) リボソーム結合領域に特定塩基配列(GAAGGA)を設計して、該遺伝子の翻訳開始点上流9塩基の位置に導入することにより、翻訳効率の向上を図る改変。

(2) 大腸菌のHind III認識部位を該遺伝子上流と下流に作成し、該遺伝子を純化して切り出し発現ベクターへ連結することにより遺伝子の発現効率の向上を図る改変。

【0015】

(第5発明の構成)

上記課題を解決するための本願第5発明(請求項5に記載の発明)の構成は、第1発明～第4発明のいずれかに係る形質転換微生物を亜鉛イオンを含む培地で培養し、培養物からD-アミノアシラーゼを取得する、D-アミノアシラーゼの製造方法である。

【0016】

(第6発明の構成)

上記課題を解決するための本願第6発明(請求項6に記載の発明)の構成は、前記第5発明に係る培地に含まれる亜鉛イオン濃度を0.1～10mMに制御する、D-アミノアシラーゼの製造方法である。

【0017】

【発明の作用・効果】

(第1発明の作用・効果)

第1発明の形質転換微生物は、亜鉛イオンの存在により発現が増強されるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を導入されており、かつ、宿主微生物も元々亜鉛耐性を示すものである。

【0018】

従って、第1発明によって、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子で形質転換された微生物であって、培地への亜鉛イオンの添加によりD-アミノアシラーゼ生産

能力が最大限に増強され得るものを提供することができる。

【0019】

(第2発明の作用・効果)

配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するD-アミノアシラーゼ産生遺伝子は、亜鉛イオンの存在により著しく遺伝子産物の発現が増強される遺伝子であることが確認された。又、配列表の配列番号1に示す塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であってD-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものも、同様の特徴を期待できる。従って第2発明により、第1発明の宿主微生物に好ましく導入することができるD-アミノアシラーゼ産生遺伝子の代表的な実施形態が提供される。

【0020】

(第3発明の作用・効果)

大腸菌は亜鉛耐性を備えることが確認された。又、大腸菌はその菌学的性質や生理的性質、培養条件や管理条件等が周知されている。従って第3発明により、D-アミノアシラーゼの高効率生産を、容易な生産管理の下に行える。

【0021】

(第4発明の作用・効果)

第4発明における(1)の改変により、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の翻訳効率が向上する。又、第4発明における(2)の改変により、D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の発現効率が向上する。従って第4発明により、形質転換微生物のD-アミノアシラーゼ生産能力を更に増大させることができる。

【0022】

(第5発明の作用・効果)

第5発明によって、第1発明～第4発明の形質転換微生物を用いたD-アミノアシラーゼの高効率製造方法が提供される。

【0023】

(第6発明の作用・効果)

第6発明によって培地中の亜鉛イオン濃度を最適化することにより、D-アミノアシラーゼのとりわけ高効率な製造方法が提供される。

【0024】

【発明の実施の形態】

次に、第1発明～第6発明の実施の形態について説明する。以下において単に「本発明」と言うときは、第1発明～第6発明を一括して指している。

【0025】

〔宿主微生物〕

本発明に係る形質転換微生物を得るための宿主微生物としては、菌体量（A_{660nm}）の増加又は減少を以て測定される培地中での繁殖能力が亜鉛イオン添加によって余り阻害されない、と言う亜鉛耐性の微生物が用いられる。この亜鉛耐性の一つの判断基準として、当該微生物の亜鉛無添加培地における菌体量（A_{660nm}）に対して、亜鉛2mM添加の同一条件培地における菌体量が増加又は10%以内の減少にとどまること、あるいは、亜鉛5mM添加の同一条件培地における菌体量が増加又は20%以内の減少にとどまること、を挙げることができる。

【0026】

上記の条件に該当する限りにおいて、宿主微生物の分類上の種類は限定されないが、一般的には、形態学的性質や生理学的性質が良く知られ、その培養条件や管理条件が周知である宿主微生物が好ましい。かかる宿主微生物の好適例として、大腸菌（*Eschericia coli*）を挙げることができる。反面、少なくとも前記A-6株を含むアルカリゲネス・キシロースオキシダンス種の微生物は、大腸菌と比較すると亜鉛耐性を備えていない。

【0027】

宿主微生物に対する上記遺伝子の導入手段については特段に限定されず、例えば、プラスミドに連結して導入する方法や、バクテリオファージDNAに連結して導入する方法等を必要に応じて任意に選択すれば良い。

【0028】

〔D-アミノアシラーゼ産生遺伝子〕

本発明に係るD-アミノアシラーゼ産生遺伝子は、D-／L-アミノアシラーゼのうちD-アミノアシラーゼのみを選択的に生産させる遺伝子であって、培地

中の亜鉛イオンの存在によりその活性発現が増強されるタイプのものである。

【0029】

このようなD-アミノアシラーゼ産生遺伝子であることが確認された好適な一例として、配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するものを挙げることができる。又、配列表の配列番号1に示す塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、D-アミノアシラーゼを有効にコードする塩基配列を有するものも好適であると考えられるが、現に培地中の亜鉛イオンにより活性発現が増強されないものは、本発明にとって好適ではない。

【0030】

配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するD-アミノアシラーゼ産生遺伝子は、自然界の土壌よりスクリーニングによって得られたD-アミノアシラーゼ産生菌である前記アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンスA-6株から取得されたものである。

【0031】

〔D-アミノアシラーゼ産生遺伝子の改変〕

上記D-アミノアシラーゼ産生遺伝子は、そのまま宿主微生物に導入することもできるが、以下の(1)、(2)の遺伝子改変を行った後に導入することが、更に好ましい。

【0032】

(1) リボソーム結合領域に特定塩基配列(GAAGGA)を設計して、該遺伝子の翻訳開始点上流9塩基の位置に導入することにより、翻訳効率の向上を図る改変。

【0033】

(2) EcoRI認識部位及びHind III認識部位を該遺伝子上流と下流に作成し、該遺伝子を純化して切り出し発現ベクターへ連結することにより遺伝子の発現効率の向上を図る改変。

〔D-アミノアシラーゼの製造方法〕

第5発明に係るD-アミノアシラーゼの製造方法においては、第1発明～第4発明の形質転換微生物を亜鉛イオンを含む培地で培養し、その培養物からD-ア

ミノアシラーゼを取得する。亜鉛イオンは、例えば塩化亜鉛、硫酸亜鉛等の亜鉛化合物を培地に適量添加することにより与えることができる。第6発明のように、培地に含まれる亜鉛イオン濃度を0.1～10 mMに制御することが、とりわけ好ましい。

【0034】

D-アミノアシラーゼの製造方法に関し、上記以外の点の実施方法や実施条件は特段に限定されないが、tacプロモーターの誘導物質（例えばイソプロピルチオガラクトシド（IPTG）、ラクトース等）を誘導物質とする栄養培地中で培養を行うこと、その際のラクトース濃度を0.1～1%程度としておくこと等が推奨される。

【0035】

【実施例】

（遺伝子の取得と塩基配列の決定）

アルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンスA-6株から得た染色体DNAを制限酵素Sau3AIで部分分解し、2～9 KbのDNA断片を分取した。

【0036】

得られたDNA断片を公知のプラスミドpUC118のBamHI認識部位に挿入連結した。この連結プラスミドにより大腸菌JM109を形質転換し、アンピリン耐性形質転換株を得た。こうして得られた形質転換株の中から、D-／L-アミノアシラーゼのうちD-アミノアシラーゼのみを選択的に生産する能力を持つ株を得た。このD-アミノアシラーゼ生産能力を持つ形質転換株は、5.8 Kbの挿入断片を持つプラスミドを保持していた。

【0037】

このプラスミド中の5.8 Kbの挿入断片をトリムダウンしてD-アミノアシラーゼ産生遺伝子の位置を推定した後、約2.0 Kbについて、常法に従い、配列表の配列番号1に示すような塩基配列を決定した。配列表には、対応するアミノ酸配列も付記する。その結果、ATGから始まる1452ヌクレオチドからなるオープンリーディングフレーム（ORF）が確認された。

【0038】

(遺伝子の改変)

上記の 5.8 K b の挿入断片を持つプラスミドから、BamHI-HindIII消化により 4 K b の DNA 断片を切り出し、公知のプラスミド pUC118 と連結することにより連結プラスミド pAND118 を作製し、これを鋳型として、配列表の配列番号 2 に示すプライマーを用いた部分特異的変異により、リボソームバインディングサイト (RBS) を改変したプラスミド pANS D1 を作製した。

【0039】

次に、上記プラスミド pANS D1 を鋳型とし、配列表の配列番号 3 及び配列番号 4 に示すプライマーを用いた部分特異的変異により、上記 RBS の直上流には EcoRI の認識部位を、又、ORF の直下流には HindIII 認識部位を、それぞれ作成してなるプラスミド pANS D1HE を得た。

【0040】

更にプラスミド pANS D1HE を制限酵素 EcoRI-HindIII で消化して得た 1.8 K b の DNA 断片を、図 1 に示すプラスミド pKK223-3 の EcoRI-HindIII 部位に挿入連結して、図 2 に示すプラスミド pKNS D2 を得た。

(形質転換大腸菌)

大腸菌 (*Eschericia coli*) K12 株由来の株を宿主として、D. HANAHAN の方法 (DNA cloning Vol.1 109~136 1985) によりプラスミド DNA を導入し、形質転換大腸菌 *E. coli* TGI/pKNS D2 を得た。

【0041】

(遺伝子取得源菌株の亜鉛耐性)

前記のアルカリゲネス・キシロースオキシダンス・サブスピーシーズ・キシロースオキシダンス A-6 株を、リン酸一カリウム 0.2%, リン酸二カリウム 0.2%, ポリペプトン 2%, 硫酸マグネシウム 0.01% 及びグリセリン 1% を含み、pH 7.2 である亜鉛無添加培地、及びこれと同一組成の培地にそれぞれ 0.2 mM, 2.0 mM 及び 5.0 mM の濃度に酸化亜鉛を添加した亜鉛添加培地において 30°C、24 時間培養し、菌体量 (A660 nm) を測定することにより、その亜鉛耐性を評価した。その際、培養後の培地 pH も測定した。その

結果を末尾の表 1 における「A-6 菌」と表記した欄に示す。

【0042】

表 1 より、亜鉛無添加培地における A-6 株の菌体量に対して、亜鉛添加培地における A-6 株の菌体量は顕著に減少しており（2.0 mM の亜鉛添加培地において約 35%、5.0 mM の亜鉛添加培地において約 60% の減少）、上記 A-6 株が亜鉛耐性ではないことが分かる。

【0043】

（宿主菌の亜鉛耐性）

宿主菌として用いた上記大腸菌 K12 株由来の株に対しても、上記の A-6 株と同様の組成の培地を用いて、同様に菌体量（A660nm）を測定することにより、その亜鉛耐性を評価した。その結果を末尾の表 1 における「TG1（宿主菌）」と表記した欄に示す。

【0044】

表 1 より、亜鉛無添加培地における宿主菌の菌体量に対して、亜鉛添加培地における宿主菌の菌体量は余り減少せず（2.0 mM の亜鉛添加培地において約 3%、5.0 mM の亜鉛添加培地において約 12% の減少。0.2 mM の亜鉛添加培地においては却って増加している）、上記宿主菌が亜鉛耐性であることが分かる。

【0045】

（形質転換大腸菌の亜鉛耐性）

形質転換大腸菌 E. coli TG1/pKNSD2 に対しても、上記の A-6 株と同様の組成の培地を用いて、同様に菌体量（A660nm）を測定することにより、その亜鉛耐性を評価した。その結果を末尾の表 1 における「pKNSD2/TG1（組換え菌）」と表記した欄に示す。

【0046】

表 1 より、亜鉛無添加培地における形質転換大腸菌の菌体量に対して、亜鉛添加培地における形質転換大腸菌の菌体量は余り減少せず（2.0 mM の亜鉛添加培地において約 5%、5.0 mM の亜鉛添加培地において約 15% の減少。0.2 mM の亜鉛添加培地においては却って増加している）、上記形質転換大腸菌が

亜鉛耐性であることが分かる。

【0047】

(形質転換大腸菌に対する亜鉛添加効果)

形質転換大腸菌 *E. coli* TG1/pKNSD2を、バクトトリプトン1%, バクトイーストエキス0.5%, 塩化ナトリウム0.5%及びアンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含むpH7.0の培地において30°Cで16時間の前培養を行った。

【0048】

続いて、前培養後の形質転換大腸菌を、リン酸一カリウム0.2%, リン酸二カリウム0.2%, ポリペプトン2%, 硫酸マグネシウム0.01%, グリセリン1%及び誘導剤としてのラクトース0.1%を含み、pH7.0である亜鉛無添加培地、及びこれと同一組成の培地にそれぞれ0.2 mM及び2.0 mMの濃度に酸化亜鉛を添加した培地において、30°Cで24時間の本培養を行い、培養液のプロスアウトpHと、培養液(A660 nm) D-アミノアシラーゼ酵素活性(U/mL)を測定した。

【0049】

その結果、亜鉛無添加培地では酵素活性が21.78 U/mL (プロスアウトpH5.05)であったのに対して、0.2 mMの亜鉛添加培地においては58.85 U/mL (プロスアウトpH5.03)、2.0 mMの亜鉛添加培地においては109.79 U/mL (プロスアウトpH5.11)の酵素活性を示し、少なくとも一定の濃度範囲における亜鉛イオンの添加によって、D-アミノアシラーゼ生産能力が顕著に向上することを確認した。

【0050】

又、比較のために、前記A-6株を上記の前培養用の培地(但しアンピシリンは無添加)において同上の条件で前培養し、更に、誘導剤を上記ラクトース0.1%からN-アセチル-L-ロイシン0.1%に変更した以外は上記の本培養用の培地と同じ組成の培地において同上の条件で本培養を行い、培養液のプロスアウトpHと、培養液(A660 nm) D-アミノアシラーゼ酵素活性(U/mL)を測定した。

【0051】

その結果、亜鉛無添加培地では酵素活性が 0.29 U/mL (ブロスアウト pH 7.47) であったのに対して、 0.2 mM の亜鉛添加培地においては 0.12 U/mL (ブロスアウト pH 7.48)、 2.0 mM の亜鉛添加培地においては 0.29 U/mL (ブロスアウト pH 7.43) の酵素活性を示し、亜鉛イオンの添加による D-アミノアシラーゼ生産能力の向上効果は認めることができなかった。

【0052】

【表 1】

菌の種類	亜鉛濃度 (mM)	培養後 pH	菌体量 (A660)	相対値 (%)
A-6 菌	0.0	7.58	8.09	100.0
	0.2	7.62	7.75	95.8
	2.0	7.56	5.23	64.6
	5.0	7.68	3.34	41.3
TG1 (宿主菌)	0.0	5.01	5.68	100.0
	0.2	4.99	5.93	104.4
	2.0	4.98	5.55	97.7
	5.0	5.01	4.98	87.7
pKNSD2/TG1 (組換え菌)	0.0	5.00	6.45	100.0
	0.2	5.01	6.70	103.9
	2.0	4.98	6.09	94.4
	5.0	5.01	5.47	84.8

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Amano Pharmaceutical Co.,Ltd

<120> 形質転換微生物、D-アミノアシラーゼの製造方法

<130> POK-99-022

<160> 1

<210> 1

<211> 1758

<212> DNA

<213> *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans*

<400> 1

gaattccact tgatcgcgga aggagagatt tcc atg tcc caa tcc gat tcc cag ccc 57

Met Ser Gln Ser Asp Ser Gln Pro

1

5

ttc gac ctg ctg ctc gcg ggc ggc acc ctc atc gac ggc agc aac acc 105

Phe Asp Leu Leu Leu Ala Gly Gly Thr Leu Ile Asp Gly Ser Asn Thr

10

15

20

ccg ggg cgg cgc gcc gac ctg ggc gtg cgc ggc gac cgc atc gcc gcc 153

Pro Gly Arg Arg Ala Asp Leu Gly Val Arg Gly Asp Arg Ile Ala Ala

25	30	35	40	
atc ggc gat ctg tgc gac gcc gcc gcg cac acc cgg gtc gac gtg tgc				201
Ile Gly Asp Leu Ser Asp Ala Ala Ala His Thr Arg Val Asp Val Ser				
	45	50	55	
ggc ctg gtg gtc gcg ccc ggc ttc atc gac tgc cac acc cac gac gac				249
Gly Leu Val Val Ala Pro Gly Phe Ile Asp Ser His Thr His Asp Asp				
	60	65	70	
aac tac ctg ctc agg cgt cgc gac atg acg ccc aag atc tgc cag ggc				297
Asn Tyr Leu Leu Arg Arg Arg Asp Met Thr Pro Lys Ile Ser Gln Gly				
	75	80	85	
gtc acc acg gtg gtc acg ggc aat tgc ggc atc agc ctg gcg ccg ctg				345
Val Thr Thr Val Val Thr Gly Asn Cys Gly Ile Ser Leu Ala Pro Leu				
	90	95	100	
gcg cac gcc aac ccg ccc gcc ccc ctg gac ctg ctg gac gaa ggc ggc				393
Ala His Ala Asn Pro Pro Ala Pro Leu Asp Leu Leu Asp Glu Gly Gly				
105	110	115	120	
tct tac cgt ttc gag cgc ttc gcc gac tac ctg gac gcg ttg cgg gcc				441
Ser Tyr Arg Phe Glu Arg Phe Ala Asp Tyr Leu Asp Ala Leu Arg Ala				
	125	130	135	
acg ccg gcg gcc gtc aac gcc gcc tgt atg gtg ggc cat tca acg ctg				489
Thr Pro Ala Ala Val Asn Ala Ala Cys Met Val Gly His Ser Thr Leu				
	140	145	150	

cgc gcc gcg gtc atg ccg gac ttg cag cgc gcc gcc acc gac gag gaa	537
Arg Ala Ala Val Met Pro Asp Leu Gln Arg Ala Ala Thr Asp Glu Glu	
155 160 165	
atc gcg gcc atg cgg gac ctg gcc gag gaa gcc atg gcc agc ggc gcc	585
Ile Ala Ala Met Arg Asp Leu Ala Glu Glu Ala Met Ala Ser Gly Ala	
170 175 180	
atc ggc att tcg acc ggc gcc ttc tac ccg ccc gcc gcc cgc gcc acc	633
Ile Gly Ile Ser Thr Gly Ala Phe Tyr Pro Pro Ala Ala Arg Ala Thr	
185 190 195 200	
acc gaa gag atc atc gag gtg tgc cgg ccg ctg agc gcg cat ggc ggc	681
Thr Glu Glu Ile Ile Glu Val Cys Arg Pro Leu Ser Ala His Gly Gly	
205 210 215	
atc tac gcc acc cac atg cgc gac gaa ggc gag cac atc gtg gcc gcg	729
Ile Tyr Ala Thr His Met Arg Asp Glu Gly Glu His Ile Val Ala Ala	
220 225 230	
ctg gag gaa acc ttc cgc atc ggc cgc gag ctg gac gtg ccg gtg gtg	777
Leu Glu Glu Thr Phe Arg Ile Gly Arg Glu Leu Asp Val Pro Val Val	
235 240 245	
atc tcg cac cac aag gtc atg ggc cag ccc aat ttc ggc cgc tcg cgc	825
Ile Ser His His Lys Val Met Gly Gln Pro Asn Phe Gly Arg Ser Arg	
250 255 260	

gag acg ctg ccg ctg atc gag gcc gcc atg gcg cgc cag gac gtc tgc 873
 Glu Thr Leu Pro Leu Ile Glu Ala Ala Met Ala Arg Gln Asp Val Ser
 265 270 275 280

ctg gac gcg tat ccc tac gtg gcc ggc tcc acc atg ctc aag cag gac 921
 Leu Asp Ala Tyr Pro Tyr Val Ala Gly Ser Thr Met Leu Lys Gln Asp
 285 290 295

cgc gtg ctg ctg gcc gga cgc acc atc atc acc tgg tgc aag ccc ttc 969
 Arg Val Leu Leu Ala Gly Arg Thr Ile Ile Thr Trp Cys Lys Pro Phe
 300 305 310

ccc gaa ctg agc ggg cgc gac ctg gat gaa gtc gcg gcc gag cgc ggc 1017
 Pro Glu Leu Ser Gly Arg Asp Leu Asp Glu Val Ala Ala Glu Arg Gly
 315 320 325

aaa tcc aag tac gac gtg gtg ccc gag ctg cag ccg gcc ggc gcc atc 1065
 Lys Ser Lys Tyr Asp Val Val Pro Glu Leu Gln Pro Ala Gly Ala Ile
 330 335 340

tac ttc atg atg gac gaa ccc gac gtg cag cgc atc ctg gcg ttc ggc 1113
 Tyr Phe Met Met Asp Glu Pro Asp Val Gln Arg Ile Leu Ala Phe Gly
 345 350 355 360

ccg acc atg atc ggc tcc gac ggc ctg ccg cac gac gag cgc ccg cat 1161
 Pro Thr Met Ile Gly Ser Asp Gly Leu Pro His Asp Glu Arg Pro His
 365 370 375

ccg cgc ctg tgg ggc acc ttc ccg cgg gtg ctg ggg cac tat gcg cgc 1209

Pro Arg Leu Trp Gly Thr Phe Pro Arg Val Leu Gly His Tyr Ala Arg
380 385 390

gac ctg ggc ctg ttc ccg ctg gag acg gcg gta tgg aag atg acc ggc 1257
Asp Leu Gly Leu Phe Pro Leu Glu Thr Ala Val Trp Lys Met Thr Gly
395 400 405

ctg acc gcc gcg cgc ttc ggc ctg gcc ggg cgc ggg cag ctg cag gcc 1305
Leu Thr Ala Ala Arg Phe Gly Leu Ala Gly Arg Gly Gln Leu Gln Ala
410 415 420

ggg tac ttc gcc gac ctg gtg gtg ttc gac ccg gcc acg gtg gcc gat 1353
Gly Tyr Phe Ala Asp Leu Val Val Phe Asp Pro Ala Thr Val Ala Asp
425 430 435

acc gcc acc ttc gaa cac cct acc gag cgc gcc gcc ggc atc cat tcc 1401
Thr Ala Thr Phe Glu His Pro Thr Glu Arg Ala Ala Gly Ile His Ser
440 445 450 455

gtg tac gtc aac ggc gcg ccg gtc tgg caa gag cag gcg ttc acc ggc 1449
Val Tyr Val Asn Gly Ala Pro Val Trp Gln Glu Gln Ala Phe Thr Gly
460 465 470

cag cat gcc ggc cgc gtg ctc gca cgc acg gcc gcc tg agcccggcgc 1497
Gln His Ala Gly Arg Val Leu Ala Arg Thr Ala Ala
475 480 483

cagcccttac aatccggcgt gaacggggcg gcgtgccgcc ccttcccaac cctggacgca 1557
aaccgctaca tggccctcc ctccgctcgc aatacggccc caccgatat cgtgggcaag 1617

gaagtgatgg gcgcgcgcct gcgcgccgag cgcaaggccc ggaaaatgac cctgcaagac 1677
ctgtcgcagg ccagcggcat cgcggtctcg accctgtcca aggccgagct gggccagatc 1737
gccctgagct acgagaagct t 1758

【図面の簡単な説明】

【図 1】

プラスミドを概念化して示す図である。

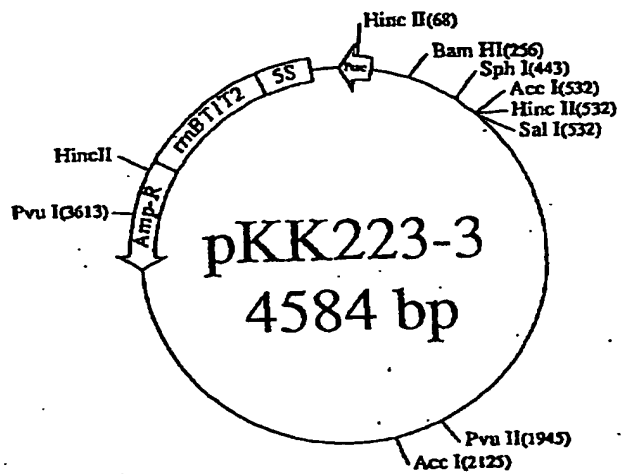
【図 2】

プラスミドを概念化して示す図である。

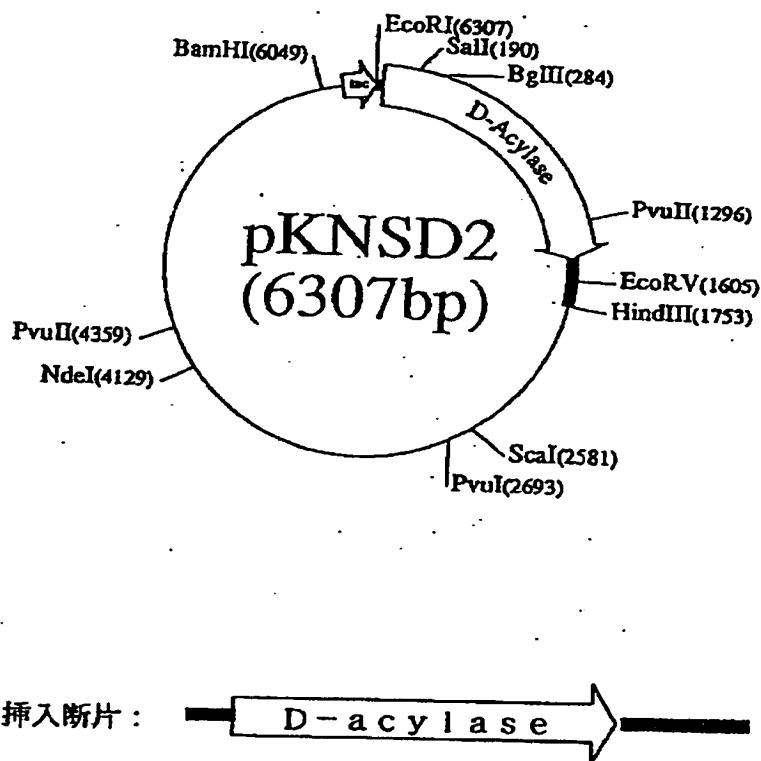
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 D-アミノアシラーゼの生産能力の高い形質転換微生物と、これによるD-アミノアシラーゼの高効率生産方法を提供する。

【解決手段】 亜鉛により発現が増強されるタイプのD-アミノアシラーゼ産生遺伝子を、亜鉛耐性の宿主微生物に導入して形質転換する。この形質転換微生物を亜鉛添加培地で培養する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000216162]

1. 変更年月日 1990年 8月10日
[変更理由] 新規登録
住 所 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
氏 名 天野製菓株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)